

Hans Georg Rossenbeck

DIE WIRKUNG VON SULFONYLHARNSTOFFEN UND
PHENYLAETHYL-BIGUANID (DBI) AUF DEN
KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL DES ISOLIERTEN
RATTENFETTGEWEBES UND DES RATTENZWERCH-
FELLS IM VERGLEICH MIT DER INSULINWIRKUNG

Frankfurt am Main 1962

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

Die Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Phenyl-
aethyl-biguanid (DBI) auf den Kohlenhydratstoff-
wechsel des isolierten Rattenfettgewebes und des
Rattenzwerchfells im Vergleich mit der Insulin-
wirkung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Hans Georg Rossenbeck
aus
Gießen/L.

Frankfurt/M. 1962



Dekan: Prof. Dr. W. Krücke
Referent: Prof. Dr. E.F. Pfeiffer
Korreferent: Prof. Dr. G. Taubmann
Mündliche Prüfung: 30. November 1962

Herrn Professor Dr. E.F. Pfeiffer, Oberarzt
der I. Medizinischen Universitätsklinik Frank-
furt am Main, möchte ich an dieser Stelle für
die Überlassung des Themas und die mir bei der
Arbeit freundlicherweise gewährte großzügige
Unterstützung meinen aufrichtigen Dank sagen.
Herrn Dr. H. Ditschuneit gilt mein Dank für
die Hilfe und Beratung bei der Einarbeitung
in die Methodik und der Durchführung der Untersu-
chungen.

G l i e d e r u n g

A. Einleitung

1. Chemische Konfiguration oraler Antidiabetica
2. Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Substanzen
3. Stoffwechsel des isolierten Rattenfettgewebes und Rattenzwerchfells und seine Beeinflussung durch oral wirksame Antidiabetica

B. Methodik

1. Allgemeiner Teil: Versuchsanordnung, Inkubationsmedien, Dosen der geprüften Substanzen, Tiermaterial
2. Spezieller biochemischer Teil
 - a) Einfluß von Sulfonylharnstoffen und Phenylaethylbiguanid (DBI) auf die Oxydation von $1\text{-C}^{14}\text{-Glukose}$ zu C^{14}O_2 durch das isolierte Rattenfettgewebe
 - b) Glukoseaufnahme des isolierten Rattenfettgewebes nach Zusatz von Sulfonylharnstoffen und DBI
 - c) Wirkung von Sulfonylharnstoffen und DBI auf die Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattenzwerchfell

C. Ergebnisse

1. Basale Oxydation von $1\text{-C}^{14}\text{-Glukose}$ zu C^{14}O_2 durch das Rattenfettgewebe in Krebs-Ringer-Pufferlösung und ihre Beeinflussung durch
 - a) D 860 (Rastinon)
 - b) Metahexamid
 - c) Chlorpropamid
 - d) Phenylaethylbiguanid
2. Steigerung der C^{14}O_2 -Bildung aus radioaktiv markierter Glukose unter Insulinwirkung
3. Wirkung auf den stimulierenden Effekt des Insulins auf die Glukoseoxydation durch das Rattenfettgewebe unter dem Einfluß von

- a) D 86o
- b) Metahexamid
- c) Chlorpropamid
- d) DBI

4. Änderung der Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattenfettgewebe nach Zusatz von

- a) D 86o
- b) DBI
- c) Metahexamid
- d) Chlorpropamid

und die Wirkung dieser Substanzen auf den die Glukoseaufnahme fördernden Effekt des Insulins

5. Einfluß auf die Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattenzwerchfell unter der Wirkung von

- a) D 86o
- b) DBI
- c) Chlorpropamid
- d) Insulin

D. Besprechung

- 1. Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Rattenzwerchfells und Rattenfettgewebes und seine Beeinflussung durch Insulin
- 2. Wirkung der Sulfonylharnstoffe
 - a) auf die Insulinsekretion
 - b) auf die Glukoseverwertung peripherer Gewebe
- 3. Wirkungsmechanismus von Biguaniden

E. Zusammenfassung

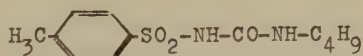
A. Einleitung

Eine große Anzahl von Diabetikern wird heute mit Medikamenten behandelt, die oral wirksam sind. Die weitaus überwiegende Zahl dieser Substanzen gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe. In den letzten Jahren werden darüberhinaus Biguanidderivate zur Behandlung des Diabetes mellitus empfohlen. Die Sulfonylharnstoffe sind als Derivate des Harnstoffs aufzufassen mit einer Aryl-Sulfonylgruppe an dem einen Ende des Harnstoffmoleküls und einer Seitenkette (Radikal) am anderen. Den besten hypoglykämischen Effekt entfalten Verbindungen mit einer gerade angeordneten aliphatischen Seitenkette von weniger als sechs bis acht Kohlenstoffatomen. Diese Konfigurationen besitzen die heute in der Klinik allgemein gebräuchlichen Medikamente: D 860, BZ 55 und Chlorpropamid. Eine Steigerung der hypoglykämischen Wirkung wurde durch Einführung eines gesättigten Benzolringes erreicht. Diese Verbindung, das Metahexamid, fand jedoch wegen toxischer Wirkungen auf die Leber keine weitere Verbreitung.

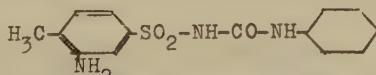
Unter den Biguanidabkömmlingen hat das Phenylaethyl-biguanid (DBI, W 32) bis heute die größte Bedeutung erlangt. Es stellt ein dimeres Kohlensäurederivat dar, das scheinbar aus zwei Guanidinmolekülen zusammengesetzt ist und eine Seitenkette in Form eines Phenylaethylrestes trägt.

Die in der vorliegenden Untersuchung verwandten hypoglykämisch wirkenden Verbindungen haben folgende chemische Konfiguration:

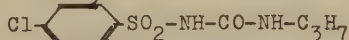
D 860:



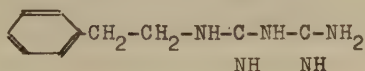
Metahexamid:



Chlorpropamid:



DBI:



Der Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe ist nach der Einführung in die Klinik durch Franke und Fuchs (1) im Jahre 1955 Gegenstand zahlreicher klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen gewesen. Diese Arbeiten haben sichere Anhaltspunkte dafür erbracht, daß die Sulfonylharnstoffe Insulinreserven aus dem Pankreas zu mobilisieren vermögen. So war schon 1944 von Loubatières (2) berichtet worden, daß die blutzuckersenkende Wirkung bei Hunden nach Entfernung des Pankreas nicht mehr nachweisbar ist. Die große Bedeutung des Pankreas im Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe lehrt auch die klinische Beobachtung, daß sich bei jugendlichen Patienten, die dem Typ des Insulinmangeldiabetes zuzuordnen sind, der Stoffwechsel durch Sulfonylharnstoffe nicht beeinflussen läßt (1,3). Im Pankreas selbst wurde dann auch eine Abnahme des Insulingehaltes und der Granulierung der beta-Zellen beobachtet (4,5). Einen weiteren direkten Beweis für die Mobilisierung von endogenem Insulin aus dem Pankreas lieferten die beobachteten Steigerungen der Serum-Insulinwirkung im peripheren Blut nach Sulfonylharnstoffinjektionen beim Menschen (6,7).

Daneben wurde aber immer die Frage diskutiert, ob den Sulfonylharnstoffen neben der Wirkung auf das Pankreas nicht auch ein Angriffspunkt im Zellstoffwechsel des peripheren Gewebes zuzuschreiben sei, wie er von den Biguanidderivaten als erwiesen gelten kann. Sollte ein derartiger Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel des peripheren Gewebes auch von den Sulfonylharnstoffen ausgeübt werden, dann wären auch damit alle beobachteten Steigerungen der Serum-Insulinwirkung bei Menschen und Tieren bei Sulfonylharnstoffbelastungen sehr in Frage gestellt.

Unsere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit galten daher der Frage,

1. ob der Kohlenhydratstoffwechsel isolierter Gewebe durch Sulfonylharnstoffe und Biguanide verändert wird und

2. ob diese Substanzen die Insulinwirkung in irgendeiner Weise zu beeinflussen imstande sind.

Als Testobjekt zum Studium des Kohlenhydratstoffwechsels eignen sich in hervorragender Weise das isolierte epididymale Rattenfettgewebe und das Rattenzwerchfell. Diese Gewebe besitzen einen sehr lebhaften Kohlenhydratstoffwechsel, der durch Insulin stark stimuliert werden kann (8,9). Im Fettgewebe lassen sich in vitro die Synthese von Glykogen, Fettsäuren und Glycerin aus Glukose (10,11,12,13) sowie die Oxydation von Glukose und vielen Zwischenprodukten des Glukoseabbaus (12,14,15) verfolgen und die Insulinwirkung methodisch besonders gut an der Steigerung der direkten Glukoseoxydation über den Pentosephosphat-shunt messen (16,17,18,19). Der Kohlenhydratstoffwechsel des Rattendiaaphragmas und seine Beeinflussung durch Insulin ist leicht am Verbrauch von Glukose aus dem Inkubationsmedium und an der Glykogenbildung quantitativ zu erfassen (8). Diese beiden Gewebe dienen daher heute auch vorwiegend zum quantitativen Nachweis kleinster Insulinmengen mit Hilfe biologischer Testmethoden (20,21). Bei Verwendung des Fettgewebes als Testobjekt wird als Maßstab für die Insulinwirkung die direkte Glukoseoxydation gewählt (21), während bei Verwendung des Rattendiaaphragmas die Glukoseaufnahme aus dem Inkubationsmedium als Maßstab für die Insulinwirkung dient (20).

Um den Einfluß oral wirksamer blutzuckersenkender Substanzen auf den peripheren Kohlenhydratstoffwechsel zu prüfen, wählten wir daher in den vorliegenden Untersuchungen den isolierten epididymalen Fettanhang und das Zwerchfell der Ratte und prüften die Wirkung von D 860, Chlorpropamid, Metahexamid und Phenylaethyl-biguanid.

B. Methodik

Der Einfluß von Sulfonylharnstoffen und Phenylaethylbiguanid (DBI) auf den Kohlenhydratstoffwechsel wurde durch Messung verschiedener Stoffwechselleistungen des isolierten epididymalen Rattenfettgewebes und des iso-

lierten Zwerchfells geprüft. Außerdem untersuchten wir die Wirkung der blutzuckersenkenden Substanzen auf den stoffwechselwirksamen Effekt von kristallisiertem Insulin. Wir bestimmten

- a) die Oxydation von 1-C^{14} -markierter Glukose zu C^{14}O_2 durch das isolierte Rattenfettgewebe,
- b) die Glukoseaufnahme durch das Rattenfettgewebe und
- c) die Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell.

1. Für die unter a) angeführten Untersuchungen verwandten wir als Inkubationslösung Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung und Pufferlösung, der 1000 microEinheiten kristallisiertes Insulin zugesetzt wurden; außerdem inkubierten das Fettgewebe in menschlichem Serum, in 1:2 mit Pufferlösung verdünntem Serum und z.T. in Serum, dem 1000 microEinheiten Insulin pro ml zugesetzt wurden.

Für die Untersuchungen b) und c) diente ebenfalls Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung mit 250 mh% Glukosegehalt mit und ohne Insulinzusatz als Inkubationsmedium.

Die Konzentrationen der einzelnen blutzuckersenkenden Substanzen wurden in der Höhe gewählt, die einem bei therapeutischer Anwendung der Medikamente beim Menschen zu erwartenden Blutspiegel entspricht. D 860 wurde daher in Konzentrationen von 200, 500 und 1000 gamma/ml, Metahexamid von 50, 100 und 500 gamma/ml und Chlorpropamid von 200 und 1000 gamma/ml dem Inkubationsmedium zugesetzt. Für DBI wählten wir Konzentrationen von 20, 50 und 100 gamma/ml.

Für unsere Untersuchungen wählten wir 180 bis 200 g schwere männliche Albino-Wistar-Ratten. Insgesamt benötigten wir 124 Tiere, davon für die Versuchsreihe a) 76 und für b) und c) je 24 Tiere.

2. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

a) Die Ratten werden bis zum Versuchsbeginn ad libitum gefüttert, durch Nackenschlag getötet und ausgeblutet. Die Bauchhöhle wird breit eröffnet, der Fetthanhang eines jeden Hodens unter größter Schonung des Gewebes mit Pinzette und scharfer Schere in etwa drei gleiche Teile von ca 80 bis 150 mg geteilt und sofort in Gläschen mit je 2 ml Inkubationslösung gebracht. Von jeder Ratte lassen sich insgesamt sechs Fettzipfel gewinnen; um die individuellen Schwankungen in der Reaktionsfähigkeit des Fettgewebes verschiedener Ratten weitgehend auszuschalten, wurde jede Bestimmung immer mit drei Fettzipfeln von zwei verschiedenen Ratten durchgeführt und aus diesen sechs Einzelbestimmungen der Mittelwert berechnet. Das Gewicht der einzelnen Fettzipfel wird durch Wägen der Gläschen vor und nach der Zugabe des Gewebes bestimmt.

Die Gläschen sind mit einem Gummistopfen fest verschlossen und werden nach Zugabe des Fettgewebes 2 min lang mit einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Koh-

Kohlendioxyd mittels einer durchgestochenen Kanüle durchgast; eine zweite Kanüle dient der Ableitung des Gasgemisches. Die Gläschen werden anschließend 2 1/2 Stunden in einem Schüttelwasserbad bei einer konstant auf 37,5°C gehaltenen Temperatur und einer Schüttelfrequenz von ca 80/min inkubiert. Danach werden 0,3 ml einer n Schwefelsäure der Inkubationsflüssigkeit mit Hilfe einer Spritze durch den Stopfen zugesetzt; ferner werden 0,2 ml einer 5n Natronlauge in ein Plastikschälchen, das unter dem Stopfen aufgehängt ist, ebenfalls mit Spritze und Kanüle ohne Öffnen des Gläschens eingefüllt. Durch die Schwefelsäure wird das gesamte gebildete Kohlendioxyd aus der Inkubationsflüssigkeit freigesetzt und von der Natronlauge adsorbiert. Zur vollständigen Adsorption des Kohlendi oxyds verbleiben die Reaktionsgefäße weitere zwei Stunden lang im Wasserbad. Danach wird der Inhalt der Plastikschälchen in vorgewogene Zentrifugengläser ausgeschüttet, in die 3 ml einer Lösung von 1,2 % Bariumchlorid und 2,7 % Ammoniumchlorid pipettiert wurden. Es bildet sich ein Niederschlag von unlöslichem Bariumcarbonat, der anschließend dreimal mit Kohlendioxyd-freiem Wasser gewaschen, 5 bis 6 Stunden bei 80°C getrocknet und dann gewogen wird. Ein Teil des Bariumcarbonats aus den Zentrifugengläsern wird nach Aufschwemmen mit 0,3 ml Aqua dest. auf Planchetten übertragen, getrocknet und dann die Aktivität mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zählrohres gemessen. Zur Berechnung der Aktivität des gesamten im Inkubationsgefäß gebildeten Kohlendi oxyds ist es notwendig, auch das Gewicht des Carbonats auf den Planchetten zu bestimmen. Daher werden die Planchetten vor und nach der Überführung des Carbonats aus den Zentrifugengläsern gewogen.

Die gemessenen und auf das gesamte Carbonatgewicht umgerechneten Impulse pro Minute werden auf das Gewicht des Fettgewebes (in mg) bezogen und der Mittelwert aus 6 Einzelbestimmungen berechnet.

Die Inkubationsflüssigkeit der Gläschen (2, ml), in die das Fettgewebe inkubiert wird, enthält 1-C¹⁴-markierte Glukoselösung von einer Gesamtaktivität von 0,04 microCurie in einer Menge von 0,1 ml und außerdem 1,9 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit (Puffer, Serum, 1:2 verdünntes Serum, jeweils mit und ohne Zusatz von 1000 microE/ml kristallisierten Insulins). Die zu prüfenden blutzuckersenkenden Substanzen werden in entsprechender Menge in die Inkubationsflüssigkeit eingewogen. Die Kontrollen ohne Medikamentenzusatz werden im gleichen Versuchsansatz mit dem Fettgewebe der gleichen Ratten durchgeführt.

Die Insulinlösung wird aus mehrfach umkristallisiertem, glukagonfreiem Insulin mit einer biologischen Aktivität von 26,75 E/mg, das von der Farbwerke Hoechst AG geliefert wurde, hergestellt. Zunächst wird das kristallisierte Hormon in n/300 Salzsäure gelöst und dann mit Pufferlösung auf 1000 microE/ml Insulin verdünnt.

Die Krebs-Ringer-Pufferlösung (pH = 7,4) wird für jeden Versuch aus Stammlösungen frisch angesetzt und hat folgende Zusammensetzung:

100 Teile	0,4%	NaCl
4 Teile	1,15%	KCl
3 Teile	1,22%	CaCl ₂
1 Teil	2,11%	KH ₂ PO ₄
1 Teil	3,82%	MgSO ₄
21 Teile	1,30%	NaHCO ₃

Das für die Stammlösungen verwandte Wasser ist kohlen-
dioxidfrees und wird in einem Destilliergerät aus Quarz
gewonnen.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird die Pufferlösung
auf 250 mg% Glukose und 250 mg% Gelatine eingestellt.

Für die Untersuchungen im Serum verwandten wir menschen-
liches Mischserum von gesunden Blutspendern.

Alle verwandten Inkubationsgefäße werden vor jedem Ver-
such sorgfältig mit Chromschwefelsäure und destillier-
tem Wasser gereinigt.

2. Der Einfluß auf die Glukoseaufnahme durch das Ratten-
fettgewebe unter Sulfonylharnstoff- und DBI-Zusatz
wurde wie folgt untersucht:

Den 180 bis 200 g schweren männlichen Ratten wird 48
Stunden vor Versuchsbeginn bis auf Wasser jede Nahrung
entzogen. Nach Dekapitation wird der epididymale Fett-
anhang jeder Seite in drei gleiche Stücke zu je 80 bis
150 mg geteilt und in 1,5 ml Krebs-Ringer-Pufferlösung
mit und ohne Zusatz von 100 microE/ml kristallisierten
Insulins für 3 Stunden bei 37,5°C im Schüttelbad (Fre-
quenz ca 80/min) inkubiert. Die Pufferlösung wurde vor-
her auf einen Gehalt von 250 mg% Glukose eingestellt.
Nach der Inkubation wird durch fortlaufende Registrie-
rung mit Hilfe des "Autoanalyzer" von Technicon/USA
(Fehler + 0,8%) der Glukosegehalt bestimmt, die vom
Fettgewebe aufgenommene Glukosemenge als Differenz zu
250 mg% errechnet und auf 100 mg Fett bezogen. Auch
bei diesen Untersuchungen wurden sechs Einzelbestim-
mungen durchgeführt und daraus der Mittelwert berech-
net. Die verschiedenen hypoglykämisch wirkenden Sub-
stanzen wurden allein und zusammen mit 1000 microE/ml
Insulin untersucht. Die Konzentrationen waren dieselben
wie in den Ansätzen, in denen die C¹⁴O₂-Bildung gemessen
wurde.

3. Die Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell wurde
in ähnlicher Weise bestimmt. Die Rattenzwerchfelle wur-
den vor der Inkubation halbiert und 15 min in eisge-
kühlter Pufferlösung aufbewahrt, wodurch die Schwankun-
gen in der Glukoseaufnahme vermindert werden sollen (9).
Je eine Zwerchfellhälfte wurde mit der zu untersuchen-
den Substanz geprüft, während die andere zur Kontrolle
verwandt wurde. Die Inkubationsdauer betrug diesmal 90
Minuten. Die Glukosedifferenz wurde hier mit Hilfe der
enzymatischen Methode nach Boehringer, Mannheim, (Feh-
ler + 1%) doppelt bestimmt und auf 100 mg Zwerchfell
(Naßgewicht) bezogen. In diesen Untersuchungen wurde
nur die Wirkung von D 860 (Konzentration 500 gamma/ml),
Chlorpropamid (250 gamma/ml), DBI (100 gamma/ml) und

Insulin (1000 microE/ml) in Pufferlösung geprüft und für jede Substanz 6 Einzelbestimmungen mit der gleichen Zahl von Kontrollen durchgeführt.

C. Ergebnisse

1. Die Oxydation von 1-C¹⁴-markierter Glukose zu C¹⁴O₂ wurde zunächst in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Pufferlösung geprüft. Dabei ergab sich eine aus allen Versuchsansätzen errechnete mittlere Basaloxydation von 1,2 (gemessen in Impulsen/min/mg Fett). Keiner der getesteten Sulfonylharnstoffe und auch DBI vermochten in den untersuchten Konzentrationen diese basale Oxydation zu verändern (Tab.1). Die in Abb.1 wiedergegebenen Schwankungen in der Oxydation nach Zusatz der blutzuckersenkenden Substanzen halten einer statistischen Prüfung nicht stand und liegen im Bereich der methodischen Fehlerbreite.
2. Dagegen steigert der Zusatz von 1000 microE/ml kristallisierten Insulins zum Inkubationsmedium die mittlere basale Glukoseoxydation von 1,20 auf 8,40 (Imp./min/mg Fett) (Tab.1, Abb.4), d. h. um 600 %.
3. Dieser starke Insulineffekt wird von den untersuchten Sulfonylharnstoffen wiederum in keiner Weise beeinflusst (Tab.1). DBI entfaltet jedoch bereits in einer Konzentration von 20 gamma/ml eine statistisch hochsignifikante Hemmung der Glukoseoxydation, die von einem Wert von $9,5 \pm 1,4$ nach Zusatz des Präparates auf $3,5 \pm 0,9$ absinkt. Noch deutlicher wird dieser Hemmeffekt bei Erhöhung der Dosis: 50 gamma DBI/ml lassen die C¹⁴O₂-Bildung von einem Wert von $9,6 \pm 1,7$ auf $2,6 \pm 0,8$ und 100 gamma DBI/ml sogar von $9,5 \pm 1,4$ auf $1,9 \pm 0,6$ sinken. Damit kommt die Insulinwirkung auf die Glukoseoxydation nahezu vollständig zum Erliegen, so daß der gemessene C¹⁴O₂-Wert ($1,9 \pm 0,6$) die basale Glukoseoxydation von 1,2 trotz Insulinzusatz kaum übersteigt (Tab.1, Abb.1).

Um den Einfluß von D 860, Metahexamid und DBI auf die Seruminsulinwirkung zu untersuchen, setzten wir diese Substanzen konzentriertem und 1:2 verdünntem menschlichem Mischserum zu. Dabei zeigte sich, daß D 860 und Metahexamid ohne jede Wirkung auf das Seruminsulin sind (Tab.1); die geringfügigen Schwankungen, die sich nach Zusatz des Präparates bei der Messung des $C^{14}O_2$ -Wertes ergaben, liegen innerhalb der methodischen Fehlerbreite. Dagegen entfaltet DBI auch hier wieder den Hemmeffekt auf die Insulinwirkung, der bereits bei der Prüfung der Substanz in Pufferlösung festgestellt wurde. Die $C^{14}O_2$ -Bildung geht unter Zusatz von 20 gamma DBI/ml von $10,7 \pm 1,5$ auf $2,5 \pm 0,7$, d.h. um 77 % des Ausgangswertes zurück (Tab.1). 50 gamma DBI/ml vermindern die Bildung des radioaktiven CO_2 von $10,7 \pm 1,4$ auf $1,6 \pm 0,4$, d.h. um 85 %, und 100 gamma DBI/ml von $8,7 \pm 1,8$ auf $1,4 \pm 0,2$, d.h. um 84 %.

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei Verwendung von 1:2 verdünntem Serum als Inkubationsmedium. Wiederum erfuhr das Serum-Insulin keinerlei Veränderung in seiner Wirkung auf die Glukoseoxydation bei Zusatz von D 860 und Meta-hexamid (Tab.1). Die Hemmung durch DBI belief sich bei den hier untersuchten Konzentrationen von 20, 50 und 100 gamma/ml auf 63 bzw. 82 bzw. 84 % des Ausgangswertes.

Das Phenylaethyl-biguanid (DBI) wurde ferner in menschlichem Mischserum geprüft, dem 1000 microE/ml kristallisiertes Insulin zugesetzt wurden. Auch bei diesen Untersuchungen ging unter DBI-Zusatz die Glukoseoxydation statistisch signifikant zurück, und zwar unter 20 gamma DBI/ml von $9,8 \pm 2,0$ auf $5,1 \pm 1,0$ (d.h. um 48 %), unter 50 gamma DBI/ml von $10,1 \pm 2,2$ auf $2,3 \pm 0,7$ (d.h. um 77 %) und unter 100 gamma DBI/ml von $8,9 \pm 1,8$ auf $1,6 \pm 0,4$ (d.h. um 84 %) (Tab.1).

4. Bei der Bestimmung des Einflusses oraler Antidiabetica auf die Glukoseaufnahme durch das Rattenfettgewebe erhielten wir folgende Ergebnisse:

Die Substanzen wurden zunächst in Pufferlösung geprüft. Dabei ließ D 860 (Tab.2, Abb.2) die basale Glukoseaufnahme des Fettgewebes völlig unverändert. Der Zusatz von Metahexamid und Chlorpropamid führt zu einer leichten Steigerung der Glukoseaufnahme von $7,8 \pm 1,9$ auf $13,2 \pm 3,2$ (50 gamma Metahexamid/ml) und auf $7,7 \pm 1,7$ (500 gamma Metahexamid/ml) bzw. von $7,8 \pm 1,7$ auf $16,5 \pm 3,5$ (200 gamma Chlorpropamid/ml) und auf $8,4 \pm 2,1$ (1000 gamma Chlorpropamid/ml). Diese Steigerungen fallen jedoch bei statistischer Prüfung in den Zufallsbereich.

Dagegen hat DBI einen deutlichen stimulierenden Effekt auf die Glukoseaufnahme durch das Rattenfettgewebe, der sich statistisch sichern läßt: wir beobachteten einen Anstieg von $7,4 \pm 2,0$ auf $17,6 \pm 3,9$ (mg Glukose/100 mg Fett $\times 10^{-2}$) bei einer Konzentration von 20 gamma DBI/ml; dies entspricht einer Steigerung um 135 %. Nach Zusatz von 100 gamma DBI/ml stieg die Glukoseaufnahme auf $15,2 \pm 4,0$, d.h. um 105 % (Tab.2, Abb.2).

Wesentlich deutlicher ist allerdings die Steigerung der Glukoseaufnahme nach Zusatz von 1000 microE Kristallisierten Insulins/ml. Diese Insulinmenge erhöht die Glukoseaufnahme des Fettgewebes von einem mittleren Basalwert von 7,8 auf 38,9, d.h. um 399 % (Tab.2, Abb.4).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Beeinflussung der Insulinwirkung durch orale Antidiabetica geprüft. Die Glukoseaufnahme durch das Fettgewebe wurde zwar durch diese Substanzen in größerem Maße verändert, doch läßt sich dieser Einfluß statistisch nicht sichern; die Ursache dürfte vielmehr in einem relativ großen Fehler bei der Glukosebestimmung zu

suchen sein (Tab.2, Abb.2). Für D 860 maßen wir eine geringe Steigerung des Insulineffekts von $22,2 \pm 5,5$ auf $24,6 \pm 6,1$ (bei 200 gamma D 860/ml) und auf $24,4 \pm 6,9$ (bei 1000 gamma/ml). Bei der Prüfung von Metahexamid ergaben sich Werte von $50,7 \pm 13,0$ auf $54,5 \pm 11,0$ (bei 50 gamma Metahexamid/ml) bzw. auf $49,5 \pm 8,0$ (bei 500 gamma Metahexamid/ml). Auch die Hemmung durch Chlorpropamid, dessen Zusatz die Glukoseaufnahme von $47,8 \pm 7,2$ auf $40,5 \pm 9,2$ (bei 200 gamma Chlorpropamid/ml) bzw. auf $28,2 \pm 6,4$ (bei 1000 gamma Chlorpropamid/ml) absinken läßt, ist statistisch dem Zufall zuzuschreiben.- DBI zeigt bei diesen Untersuchungen eine leichte unterstützende Wirkung auf den Insulineffekt. Die Glukoseaufnahme steigt von $35,0 \pm 5,1$ auf $43,2 \pm 6,9$ unter 20 gamma DBI/ml und auf $42,4 \pm 7,0$ unter 100 gamma DBI/ml an. Dies entspricht einer maximalen Förderung um 23 %, die sich aber statistisch nicht sichern läßt (Tab.2, Abb.2). Die Steigerung der Insulinwirkung entspräche zwar dem in vivo zu beobachtenden hypoglykämischen Effekts des Biguanids, sie konnte aber in der vorliegenden Untersuchung statistisch nicht bewiesen werden.

5. In Tab.3 und Abb.3 sind die Ergebnisse zusammengestellt die bei der Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell nach Zusatz von D 860, Chlorpropamid, DBI und Insulin gemessen wurden. Das Ergebnis ist in mg Glukose $\times 10^{-2}$ pro 100 mg Muskelgewebe angegeben. Hierbei zeigt sich wiederum, daß Insulin den stärksten Effekt entfaltet. Die Basalaufnahme wird durch 1000 microE Insulin/ml von $53,2 \pm 9,9$ auf $85,6 \pm 7,9$ gesteigert, d.i. um 61 %. Die vergleichsweise wesentlich stärkere Stimulierung der Glukose-Utilisation durch das Fettgewebe (399 %) könnte einerseits auf eine längere Inkubationsdauer (3 Stunden, Zwerchfell 90 min), andererseits auch auf einen wesentlich stärkeren insulinabhängigen Stoffwechsel sowie auf die größere Oberfläche des epididymalen Fettgewebes zurückgeführt werden.- D 860 zeigte in der

untersuchten Konzentration von 50 gamma/ml keinerlei Einfluß auf die Glukoseaufnahme des isolierten Rattenzwerchfells.- Der Zusatz von Chlorpropamid (250 gamma/ml) und DBI (100 gamma/ml) bewirkt eine geringe Steigerung der Glukoseaufnahme von $51,6 \pm 10,0$ auf $58,3 \pm 10,3$ bzw. von $49,8 \pm 9,3$ auf $56,4 \pm 6,4$, d.h. um jeweils 13 %, die sich bei statistischer Prüfung wegen der starken Streuung der Einzelbestimmungen als in den Zufallsbereich fallend erweist (Tab. 3, Abb.3, Abb.5).

D. Besprechung

1. Der Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Rattenzwerchfells und des epididymalen Rattenfettgewebes und seine Beeinflussung durch Insulin.

Der Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Rattenzwerchfells und Rattenfettgewebes ist in den vergangenen Jahren intensiv bearbeitet worden. Gemmill (8) zeigte 1941 als erster, daß die Glukoseaufnahme und die Glykogenbildung durch das Rattenzwerchfell in vitro durch Zusatz von Insulin zum Inkubationsmedium gesteigert wird. Diese Beobachtung wurde später von vielen Untersuchern bestätigt. Krahl (9) konnte 1951 nachweisen, daß Insulin auch die Glukoseaufnahme des isolierten Rattenfettgewebes stimuliert und die Umwandlung in Glykogen sowie die Oxydation zu Kohlendioxyd zu beschleunigen vermag. In Fortsetzung dieser Experimente fanden Milstein und Hausberger (22) und später auch Winegrad und Renold (18) bei Verwendung von radioaktiv markierter Glukose und isoliertem Rattenfettgewebe einen stimulierenden Insulineffekt auf die Fettsynthese aus verschiedenen Glukosebausteinen.

Die Markierung bestimmter Kohlenstoffatome des Glukosemoleküls ermöglichte die Aufklärung der Wege, die die aufgenommene Glukose beim Abbau im intermediären Stoffwechsel nimmt. Diese Untersuchungen führten zu der überraschenden Beobachtung durch Milstein (16), daß Insulin quantitativ unterschiedliche Wirkungen auf den intermediären Kohlenhydratabbau entfaltet. Bei Verwendung von Glukose, in der nur das Kohlenstoffatom in der 1. Position markiert ist ($1\text{-C}^{14}\text{-Glukose}$), erfährt die C^{14}O_2 -Bildung durch Insulin eine Steigerung um 700 %, während der Effekt bei $6\text{-C}^{14}\text{-Glukose}$ nur 50 % beträgt. Diese Eigenschaft des Insulins wurde von anderen Autoren (17, 18, 19) bestätigt und auf eine selektive Förderung der direkten Glukoseoxydation über den Pentosephosphat-shunt (Dickens-Horecker-Zyklus) zurückgeführt. In unseren eigenen Untersuchungen wurde deshalb an C-1 markierte

Glukose verwandt, da die Bildung von radioaktivem $C^{14}O_2$ einen besonders empfindlichen Maßstab für die Insulinwirkung darstellt.

Bei der Bestimmung der Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell erzielten wir durch 1000 microE Insulin/ml während einer Inkubationsdauer von 90 min eine Steigerung der Aufnahme um 61 %. Ein direkter Vergleich der von anderen Autoren gemessenen Insulinwirkung mit der unsrigen ist nicht möglich, da Winegrad und Renold (18) dem Inkubationsmedium eine weit größere Insulinmenge, nämlich 0,1 E/ml, zusetzten (in unseren Untersuchungen 1000 microE/ml), Groen (20) und Vallance-Owen (24) die Glukoseaufnahme nicht auf das Naß-, sondern auf das Trockengewicht des inkubierten Zwerchfells bezogen und Randle (23) ebenfalls nicht vergleichbare Insulinkonzentrationen verwandte.

Die Glukoseaufnahme des Rattenfettgewebes konnte durch Insulin dagegen wesentlich stärker stimuliert werden als die des Zwerchfells. Durch die gleiche Insulinkonzentration (1000 microE/ml) stieg die Aufnahme fast um 400 % an. Die in der Literatur mitgeteilten Ergebnisse liegen in ähnlichem Bereich. So fand Beigelman (25) unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine Steigerung der Glukoseaufnahme um ca 240 %.

Das Fettgewebe ist somit bezüglich der Glukoseaufnahme wesentlich empfindlicher als das Muskelgewebe. Vergleicht man die Basalaufnahme von Zwerchfell und Fettgewebe miteinander, dann ergeben sich ebenfalls auffallende Unterschiede zwischen diesen beiden Gewebsarten, die in gleichem Sinne zu deuten sind. Die Glukosebasalaufnahme des Zwerchfells übertrifft mit $53,2 \times 10^{-2}$ mg Glukose/100 mg Gewebe die des Fettgewebes mit $7,8 \times 10^{-2}$ mg Glukose/100 mg Gewebe um ungefähr das Siebenfache. Diese Tatsache ist nicht allein mit dem höheren Proteingehalt des Muskelgewebes zu erklären, sondern weist auf eine Eigenschaft des Muskelgewebes hin, Glukose auch ohne Insulin in die Zelle aufzunehmen. In neuester Zeit wurden für diese Annahme interessante Beobachtungen von Dulin (26)

mitgeteilt. Er fand eine vermehrten Verbrauch von Glukose im arbeitenden Muskel. Da diese Untersuchungen an eviscerierten Tieren durchgeführt wurden, war jede Mitwirkung von Insulin ausgeschaltet.

Einen Insulin-unabhängigen Stoffwechsel des Muskelgewebes lassen auch klinische Beobachtungen vermuten. So ist bei Diabetikern auch im Zustand extremen Insulinmangels, im Coma diabeticum, die grobe Kraft der Muskulatur weitgehend erhalten und das Zwerchfell bei der großen Kußmaulschen Atmung sogar zu maximaler Arbeitsleistung fähig. Die Möglichkeit, daß der Energieverbrauch der Muskulatur im Coma diabeticum allein durch Fettsäuren gedeckt wird, erscheint unwahrscheinlich.

Eine besonders enge Verknüpfung von Stoffwechselvorgängen im Fettgewebe mit hormoneller Insulinwirkung zeigt ebenfalls ein Beispiel aus der Klinik: es ist eine bekannte Tatsache, daß der Insulinbedarf von Übergewichtigen Diabetikern durch Gewichtsabnahme entscheidend vermindert werden kann.

2. a) Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf die Insulinsekretion.

Die heute am weitesten verbreitete Ansicht über den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe besteht in der Annahme eines direkten Einflusses dieser Substanzen auf den Inselapparat des Pankreas. Loubatières (2) stellte bereits 1944 bei seinen Untersuchungen an pankreatektomierten Hunden fest, daß eine intakte Bauchspeicheldrüse die notwendige Voraussetzung für die Wirksamkeit der Sulfonylharnstoffe darstellt: die Blutzuckersenkung blieb nach der Pankreatektomie und nachfolgenden Sulfonylharnstoffinjektion aus. Eine weitere Unterstützung erfuhr diese These des pankreasabhängigen Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe 1955 durch die Untersuchungen von Franke und Fuchs (1) sowie Bertram u. Mitarb. (3). Diese Autoren berichteten über die Einstellbarkeit der noch über eine eigene Insulinproduktion verfügenden sthenischen Altersdiabetiker und das Fehlen jeden blutzuckersenkenden Effektes beim asthenischen ju-

gendlichen Insulinmangeldiabetiker bei Gabe von D 860.

Diese Beobachtungen decken sich gut mit den Experimenten an alloxandiabetischen Kaninchen, die von Creutzfeld und Böttcher (27) durchgeführt wurden: während beim leichten und mittelschweren Alloxandiabetes, bei dem das Pankreas noch funktionstüchtiges Inselgewebe in geringem Maße enthält, eine Blutzuckersenkung beobachtet werden kann, erweist sich D 860 beim schweren progredienten Alloxandiabetes, der mit Lipämie und Acetonurie einhergeht, als unwirksam.

An der Frankfurter I. Medizinischen Universitätsklinik konnten Pfeiffer u. Mitarb. nachweisen, daß der Insulingehalt des Pankreas beim Kalb (4) und bei der Ratte (5) unmittelbar nach der Injektion von D 860 abnimmt und der Plasma-Insulinspiegel in der Vena portae beim Hund (6) und bei der Ratte (7) sowie im peripheren Blut Bei Mensch und Ratte (7) ansteigt. Das Ergebnis der Blut-Insulin-Bestimmungen wurde aber nicht durch einen direkten quantitativen chemischen Nachweis des Insulins erzielt, sondern durch eine biologische Testmethode, bei der das isolierte epididymale Rattenfettgewebe und radioaktiv markierte Glukose verwandt wurden. Dieses Verfahren, das die "insulin-like activity" des Serums im Vergleich zu der Wirkung von kristallisiertem tierischen Insulin zu messen gestattet, schließt eine Beteiligung der nach Injektion im Serum enthaltenen Sulfonylharnstoffe nicht sicher aus, Unsere Untersuchungen galten daher auch der speziellen Frage, ob die Sulfonylharnstoffe allein ohne Insulin einen Stoffwechselseffekt am isolierten epididymalen Fettgewebe und Zwerchfell in vitro zu entfalten vermögen.

2. b) Die Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf die Glukoseverwertung peripherer Gewebe.

Die Mehrzahl der Autoren neigt heute auf Grund zahlreicher experimenteller Untersuchungen dazu, den Sulfonylharnstoffen keinen Einfluß auf den Kohlenhydratstoff-

wechsel des peripheren Gewebes zuzuschreiben. So konnten Craig u. Mitarb. (28) die nach Insulininjektion zu beobachtende arterio-venöse Glukosedifferenz durch Injektion von D 860 nicht erzielen. Auch Recant und Fischer (29) injizierten 1 g D 860 in die Cubitalvene und stellten in dem durch Punktion der Femoralarterie gewonnenen Blut keinen Abfall der Glukosekonzentration fest. Ebenfalls ein negatives Ergebnis erhielten Ashmore u. Mitarb. (30). Sie konnten keinen dem Insulin ähnlichen stimulierenden Effekt auf die Glukoseaufnahme des isolierten Rattenzwerchfells und keinen die Insulinwirkung unterstützenden Effekt von D 860 nachweisen. Auch die dem Insulin eigene Stimulierung der Fettsynthese aus markierter Glukose wurde für D 860 nicht beobachtet. Cahill u. Mitarb. (31) prüften in derselben Versuchsanordnung wie wir die Verwandten die Wirkung von Sulfonylharnstoffen auf die Glukoseaufnahme des Rattenzwerchfells, wobei sie abermals die Wirkungslosigkeit dieser Substanzen auf die periphere Glukose-Utilisation zeigen konnten. Bei Zusatz von Insulin zum Inkubationsmedium in verschiedenen Konzentrationen (25 bis 0,25 mE/ml) vermochten die Sulfonylharnstoffe weder die Insulinwirkung zu unterstützen noch die Wirkung unterschwelliger Insulindosen zu erhöhen.

Field (32) untersuchte den Effekt von Sulfonylharnstoffen auf das Rattenzwerchfell nicht nur an der Glukoseaufnahme, sondern auch an der Glykogenablagerung im Gewebe und kam dabei ebenfalls zu einem negativen Ergebnis. Auch C. v. Holt (33) konnte am Rattenzwerchfell keinen Insulin-potenzierenden Effekt der Sulfonylharnstoffe beobachten.

Im Gegensatz zu diesen zahlreichen negativen Ergebnissen finden sich in der Literatur einige Angaben von Autoren, die einen direkten Einfluß der Sulfonylharnstoffe auf den Kohlenhydratstoffwechsel des Rattenzwerchfells im Sinne einer Steigerung der Glukose-Utilisation beschreiben. Besonders eindrucksvolle, statistisch gesicherte Resultate wurden von Rafaelsen und Lundbaek (34,35) vor-

gelegt. Diese Autoren beschreiben eine Steigerung der Glukoseaufnahme durch das Zwerchfell von normalen Ratten aus einem 35 mg% D 860 enthaltenden Inkubationsmedium um 37,7 %. Der Glykogengehalt des Gewebes blieb jedoch trotz der Glukoseeinschleusung unbeeinflusst. Um eine Mitbeteiligung des im Zwerchfell enthaltenen Insulins im Sinne einer Wirkungspotenzierung durch D 860 auszuschließen, wiederholten Rafaelsen und Lundbaek ihre Untersuchungen mit alloxandibetischen Ratten. Dabei ergab sich, daß zwar nach Ausschaltung des Inselapparates durch Alloxan das Zwerchfell wesentlich weniger Glukose aufzunehmen imstande war als das Zwerchfell von stoffwechselgesunden Kontrolltieren, daß sich aber durch Zusatz von D 860 (35 mg%) eine Steigerung der Glukoseaufnahme um 40 bis 93 % erzielen läßt(!). In der gleichen Publikation untersuchten die Autoren vergleichsweise die Wirkung von 100 000 microEinheiten kristallisierten Insulins/ml und fanden dabei eine Stimulation der Glukoseaufnahme um 129 %. Damit entspräche der beobachtete Effekt von D 860 bei der bekannten logarithmischen Abhängigkeit von Insulinkonzentration und Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell einem Insulineffekt von ungefähr 10 000 micrE Insulin/ml. Ein derart starker blutzuckersenkender peripherer Effekt von D 860 widerspricht aber allen bisher bekannten klinischen Befunden. Schwere hypoglykämische Reaktionen nach Verabreichung von Sulfonylharnstoffen wären unausbleiblich. Sie konnten bisher jedoch nicht beobachtet werden.

Unsere eigenen Untersuchungen am isolierten Rattenzwerchfell führten zu negativen Ergebnissen. Die verwandten Sulfonylharnstoffe ließen in der geprüften Dosierung, die im Bereich der Blutkonzentration bei therapeutischer Anwendung am Patienten liegt, keinen statistisch sicherungsfähigen Einfluß auf die Glukoseaufnahme erkennen. Auch war eine Beeinflussung der Wirkung von zugesetztem exogenem Insulin und auch von endogenem

Seruminsulin weder im fördernden noch im hemmenden Sinne zu beobachten.

Um den Einfluß von Sulfonylharnstoffen auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten epididymalen Fettanhangs der Ratte, der am empfindlichsten auf kleinste Insulinmengen reagiert und deshalb zur Insulinbestimmung im Blut Verwendung findet, wurde von Renold u. Mitarb. (36) und von Candela und López-Quijada (37) berichtet. Renold und seine Mitarbeiter stellten eine geringe, statistisch nicht signifikante Steigerung der Glukoseoxydation durch Sulfonylharnstoffe fest. Der beobachtete Effekt entspricht ungefähr der Wirkung von 100 micro-Einheiten kristallisiertem Insulin. Candela u. Mitarb. untersuchten die Glukoseaufnahme und die Glykogenbildung am isolierten Rattenfettgewebe und fanden bei Verwendung von 25 gamma D 860/ml eine statistisch signifikante Steigerung beider Stoffwechselleistungen. Der Insulineffekt wurde vergleichsweise nicht getestet.

Unsere eigenen Untersuchungen lassen keinen statistisch signifikanten Einfluß der Sulfonylharnstoffe auf die direkte Oxydation der Glukose erkennen. Auch eine Beeinflussung der Wirkung von kristallisiertem und endogenem Insulin konnte bei keinem der geprüften Sulfonylharnstoffe nachgewiesen werden. Ebenso wirkungslos verhielten sich diese Substanzen gegenüber der Glukoseaufnahme durch das isolierte Rattenfettgewebe und Rattenzwerchfell. Die gemessenen geringen Veränderungen des Glukoseverbrauchs aus dem Inkubationsmedium nach Zusatz der Präparate liegen innerhalb der methodischen Fehlerbreite und lassen sich in keinem Falle statistisch sichern. In den vorliegenden Untersuchungen wird damit gezeigt, daß

1. die Sulfonylharnstoffe der Glukose den Weg weder in die Muskelzelle noch in die Fettzelle hinein zu eröffnen vermögen und daß
2. diese Stoffe den stimulierenden Effekt von kri-

stallisiertem bzw. endogenem Serum-Insulin auf die Glukose-Utilisation weder im positiven noch im negativen Sinne beeinflussen.

Die blutzuckersenkende Wirkung der Sulfonylharnstoffe beruht somit auf einer Stimulierung der Insulinsekretion des Pankreas und nicht auf einer direkten Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels peripherer Gewebe. Die beobachtete Steigerung der Seruminsulinwirkung nach Injektion von Sulfonylharnstoffen, die durch biologische Testverfahren von Pfeiffer u. Mitarb. (4,5,6,7) gezeigt werden konnte, läßt sich also auch nicht auf die im Blute zirkulierenden Sulfonylharnstoffe zurückführen, sondern dürfte vielmehr tatsächlich auf einem erhöhtem Gehalt des Blutes an endogenem Insulin beruhen. Die Interferenz anderer Stoffwechselhormone als Insulin auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Gewebes bei quantitativer Seruminsulinbestimmung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Ditschuneit u. Mitarb., 38,39).

3. Wirkungsmechanismus von Biguaniden.

Von grundsätzlich anderer Natur als der Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe erwies sich der des Phenyläthyl-biguanids (DBI), einer synthetischen Substanz, die 1956 von Ungar, Freedman und Shapiro (40) in die Klinik eingeführt wurde. Diese Verbindung zeigt enge chemische Verwandtschaft zum Methylguanidin, bei dessen Anwendung Watanabe (41) schon 1918 hypoglykämische Reaktionen am Tier beobachtete. Diese Feststellung führte 1926 zur Entdeckung des Synthalin A durch Frank, Nothmann und Wagner (42). Diese Verbindung, ein Decamethylendiguandin, wurde wegen ihrer blutzuckersenkenden Eigenschaften zur Behandlung des Diabetes mellitus herangezogen. Es erwies sich jedoch sehr bald auch in geringen Dosen als toxisch; Leberparenchym- und Nierenschädigungen traten bereits nach ein bis zwei Tagen der Therapie mit Synthalin A auf, weshalb es wie zahlreiche

andere Guanidinderivate von der klinischen Anwendung wieder ausgeschlossen wurde.

Das von Ungar u. Mitarb. (40) vorgeschlagene DBI soll eine größere therapeutische Breite besitzen. Es entfaltet ebenso wie alle anderen Guanidderivate auch bei alloxandiabetischen (40) sowie bei pankreatektomierten und hepatektomierten Ratten (43) einen starken hypoglykämischen Effekt. Ferner erwies es sich auch beim jugendlichen Diabetiker als wirksam (44,45). Es besteht also ein grundlegender Unterschied zu den Sulfonylharinstoffen, der darauf beruht, daß DBI zur Blutzuckersenkung keines funktionstüchtigen Inselzell- und Lebergewebes bedarf.

Der direkte Einfluß von Guanidderivaten auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel peripherer Gewebe wurde von Williams u. Mitarb. (46) auch bei in-vitro-Ver suchen am isolierten Rattenzwerchfell bestätigt. Diese Autoren fanden eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme durch das Muskelgewebe nach Zusatz von DBI; die vermehrte Glukoseeinschleusung führte jedoch nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Verminderung des Muskelglykogengehalts. Dagegen stieg der Milchsäure- und Brenztraubensäuregehalt des Inkubationsmediums stark an. Diese Beobachtungen könnten damit erklärt werden, daß die vermehrt aufgenommene Glukose nicht bis zu ihrem Endprodukt verbrannt wird, andererseits auch nicht zu Glykogen synthetisiert wird. Außerdem setzte DBI die Sauerstoffaufnahme und die Bildung von CO_2 am isolierten Rattenzwerchfell herab. Auch bei in-vivo-Untersuchungen stellten Williams u. Mitarb. (46) eine signifikante Abnahme des Leberglykogengehalts DBI-behandelter Meerschweinchen fest; dagegen verminderte sich der Muskelglykogengehalt nur geringfügig. Als Nebentbefund wurde eine Verlangsamung des Rest-N-Anstiegs nephrektomierter Tiere festgestellt und mit einer durch DBI gehemmten Glukoneogenese in Zusammenhang gebracht.

Den verminderten Sauerstoffverbrauch unter DBI-Wirkung deuten Steiner und Williams (47) als eine Hemmung von

Fermenten der Atmungskette. Sie konnten in sehr subtilen Untersuchungen nachweisen, daß DBI eine Hemmung des Warburthschen Atmungsfermentes (Cytochromoxydase) bewirkt. Wick u. Mitarb.(48) beschreiben dagegen eine Hemmung des Elektronentransportes über die Atmungskette beim Cytochrom c.

In neuester Zeit wurden die Beobachtungen von Steiner und Williams (47) durch Experimente von Ungar u. Mitarb. (49) bestätigt. Diese Autoren wiesen jedoch gleichzeitig darauf hin, daß die zur Hemmung der Atmungskette erforderlichen DBI-Konzentrationen weit oberhalb des wirk-samen Blutspiegels bei Mensch und Tier liegen. Viel ge-ringere Konzentrationen sind nach den Untersuchungen von Ungar bereits imstande, DPN-abhängige Schritte zu blok-kieren, nämlich die Dehydrierung der Zitronensäure, der alpha-keto-Glutar-, der Fumar-, der Oxalessig- und der Brenztraubensäure.

Eine Hemmung dieser Reaktionen läßt sich jedoch auch mit einer Reihe anderer Substanzen erreichen, die kei-ne hypoglykämische Wirkung entfalten, wie z.B. p-Amino-phenol (50), Diaethylstilboestrol (51), Sulfonamide (52), Chlormpromazin (53) u.a.

Auch Forbath und Clarke (54) sicherten bei ihren in-vitro-Experimenten mit dem isolierten Rattenzwerchfell die bereits bekannten Wirkungen von DBI; Steigerung der Glukoseaufnahme, Abnahme des Zwerchfellglykogens, An-stieg des Milchsäuregehaltes. Als bemerkenswerte Tat-sache fanden sie außerdem einen gesteigerten Anfall von organischem Phosphat, den sie auf eine Unterbrechung des Embden-Meyerhof-Weges zurückführten.

Weitere Untersuchungen galten der Frage nach dem Sauer-stoffverbrauch isolierter Gewebe unter DBI-Wirkung. Da-bei wurde in vitro an Leberschnitten (47), im Muskel (46) und im Fettgewebe (48) eine Abnahme des O₂-Verbrauchs beobachtet. Wick u. Mitarb.(48) deuten dies als Wirkung eines enzymatischen Blocks zwischen Bernsteinsäuredehydro-genase und Cytochrom c, während Steiner und Williams (47)

wie erwähnt, eine Hemmung der Cytochromoxydase annehmen.

In unseren eigenen Untersuchungen am isolierten Gewebe konnten wir ebenfalls zeigen, daß die blutzuckersenkende Wirkung des DBI von der des Insulins grundsätzlich verschieden ist. Zwar erfährt die Glukoseaufnahme am Rattenzwerchfell eine erhebliche, am Rattenfettgewebe sogar eine signifikante Steigerung, die $C^{14}O_2$ -Bildung aus $1-C^{14}$ -Glukose unterliegt jedoch einer hochgradigen Hemmung. Dieses radioaktive Kohlendioxyd wird bei der Umwandlung von 6-Phosphorgluconsäure zu Ribulose-5-phosphat im Pentose-Phosphat-Zyklus abgespalten. Besonders deutlich zeigt sich dieser Hemmeffekt auf die Decarboxylierung daran, daß DBI auch die stimulierende Wirkung des endogenen Serum-Insulins und des kristallisierten, dem Inkubationsmedium zugesetzten Insulins auf die direkte Glukoseoxydation fast völlig aufzuheben vermag. Dieser zum Insulin antagonistische Effekt beruht nicht auf einer direkten Wirkung des DBI auf das Inselzellhormon, sondern dürfte in einer Beeinflussung des durch Insulin besonders geförderten Pentose-Phosphat-Zyklus zu suchen sein, dessen fast vollständige Unterbrechung eine signifikante Abnahme der $C^{14}O_2$ -Produktion des Fettgewebes zur Folge hat.

Wie wird nun aber der Regulationsmechanismus in Gang gesetzt, der über eine Drosselung des Pentose-Phosphat-Zyklus zu einer vermehrten Glukoseaufnahme und damit zu einer Senkung des Blutzuckers führt?

Bei allen Diskussionen über den Wirkungsmechanismus von Guanidderivaten wird immer wieder auf den Pasteur-Effekt verwiesen. Pasteur beobachtete, daß die Glykolyse von Hefezellen unter anaeroben Bedingungen durch Sauerstoffzutritt vermindert wird und daß damit gleichzeitig der Glukoseverbrauch absinkt. DBI soll eine Umkehr dieses Pasteur-Effektes in dem Sinne bewirken, daß die Sauerstoffaufnahme des Gewebes unter DBI-Wirkung stark abnimmt. Als Beweis für die dadurch ausgelöste Glykolysesteigerung wird der Anstieg von Milchsäure und Brenz-

traubensäure angeführt. Für den Stoffwechsel des Gewebes ist es aber wohl doch von wesentlicher Bedeutung, ob der Sauerstoff nicht zur Verfügung steht, wie bei den Pasteurschen Versuchen, oder ob der vorhandene Sauerstoff nicht verbraucht werden kann, wie nach Anwendung von DBI. So läßt sich der Pasteur-Effekt nicht vorbehaltlos als Erklärung für die blutzuckersenkende DBI-Wirkung anführen.

Die Blockierung des Pentose-Phosphat-Zyklus, die durch unsere experimentellen Untersuchungsergebnisse an der Abnahme der $C^{14}O_2$ -Bildung aus $1-C^{14}$ -Glukose nachgewiesen wurde, wird auch eine Abnahme des Reduktionsgrades der Triphosphorpyridinnucleotide zur Folge haben, die als Coenzyme die Oxydation von Glukose-6-phosphat und von 6-Phosphorgluconsäure katalysieren. Der von den Triphosphorpyridinnucleotiden gebundene Wasserstoff wird im Zellstoffwechsel für zahlreiche Synthesen benötigt, aber auch direkt oder über Diphosphorpyridinnucleotide zur Energiegewinnung an die Atmungskette weitergegeben. Eine Unterbrechung des Pentose-Phosphat-Zyklus muß demnach letzten Endes zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch führen. Die Folge wird ein Abfall des Zellgehaltes an energiereichen Phosphatverbindungen sein, den die Zelle durch vermehrten Einstrom und Abbau von Glukose über den Emden-Meyerhof-Zyklus auszugleichen versuchen wird. Der über den Emden-Meyerhof-Weg gesteigerte Substratdurchsatz gerät jedoch beim Übergang in den Tri-carbonsäure-Zyklus ebenfalls ins Stocken, da infolge Fehlens von reduzierten Triphosphorpyridinnucleotiden nur ungenügende Mengen von Brenztraubensäure über die Äpfelsäure in den Zitronensäure-Zyklus eingeschleust werden können. Die vermehrt anfallende Brenztraubensäure wird zu Milchsäure reduziert und in den Extrazellularraum abgegeben. Dadurch steigen im Blut bei mit DBI behandelten Menschen und Tieren und im Inkubationsmedium bei in-vitro-Versuchen Milch- und Brenztraubensäure an. Nach unseren Untersuchungsergebnissen beruht also wahrscheinlich die blutzuckersenkende Biguanid-

wirkung auf einem Kompensationsmechanismus der Zelle, der durch die Drosselung des Glukoseabbaus über den Pentose-Phosphat-Zyklus ausgelöst wird.

Diese Überlegungen werden allerdings durch weitere Stoffwechseluntersuchungen experimentell zu klären sein.-

Die im Vorangehenden zitierten und durch eigene Untersuchungen belegten Wirkungen des DBI auf den intermediären Stoffwechsel der Kohlenhydrate lassen die Unverträglichkeitserscheinungen, die in allen klinischen Erfahrungsberichten beschrieben werden (55,56,57,58 u.a.) leicht erklärlich erscheinen. Als frühe Nebenerscheinungen, die bei 2/3 der mit DBI behandelten Patienten auftreten, werden Appetitlosigkeit, Schwindel, Erbrechen und Durchfälle angegeben, während nach länger dauernder DBI-Therapie sogar Gewichtsverlust, Schwäche und Lethargie beobachtet werden. Diese Symptome verschwinden jedoch ausnahmslos nach Absetzen des Präparates, woraus geschlossen werden kann, daß die Zellstoffwechselstörungen, die durch DBI hervorgerufen werden, reversibel sind. Hall u. Mitarb. (58) wiesen darauf hin, daß DBI Azidosen nicht zu beseitigen imstande ist, sondern daß sich im Gegenteil unter der DBI-Therapie Azidosen leicht entwickeln können, deren Auftreten durch geringe Mengen Insulin verhindert werden kann. Allerdings wird auch über einen Fall therapieresistenter Azidose mit tödlichem Ausgang berichtet (59), obwohl der Patient außer mit DBI auch noch mit Insulin substituiert worden war.

Unter diesen Gesichtspunkten und unter Berücksichtigung der durch DBI hervorgerufenen Fermentschädigungen erscheint die therapeutische Berechtigung des DBI stark in Frage gestellt.

Tabelle 1. *Oxydation von 1-¹⁴C-Glucose zu ¹⁴CO₂ durch Rattenfettgewebe nach Zusatz von Sulfonylharvestoffen und Biguanid (DBI) (Imp./min/mg Fett)*

Präparat (% ml)	Puffer	Puffer + 1000 µE ml Insulin	Serum konzentriert	Serum verdünnt 1:2	Serum 1000 µE ml Insulin
D 860 (Rastinon)	—	0,6 ± 0,08	—	—	—
	200	0,7 ± 0,06	8,3 ± 1,3 (7,3 ± 0,9)	4,3 ± 0,5 (4,2 ± 1,0)	3,4 ± 0,3 (3,2 ± 0,8)
	500	0,5 ± 0,08	8,2 ± 1,4 (8,4 ± 1,3)	4,5 ± 0,4 (4,1 ± 1,0)	4,5 ± 0,5 (3,8 ± 0,3)
	1000	0,6 ± 0,09	8,5 ± 1,2 (9,5 ± 1,7)	5,1 ± 1,2 (6,1 ± 1,1)	3,6 ± 0,1 (3,7 ± 1,1)
	—	1,8 ± 0,4	6,5 ± 0,3	—	—
Metahexamid	50	1,5 ± 0,4	7,0 ± 0,7	4,2 ± 1,2 (4,0 ± 1,3)	3,1 ± 1,0 (3,0 ± 0,8)
	100	1,5 ± 0,2	6,9 ± 0,5	4,0 ± 1,1 (4,0 ± 1,2)	3,3 ± 0,9 (3,0 ± 0,8)
	500	1,2 ± 0,4	7,6 ± 1,5	3,9 ± 1,4 (3,4 ± 1,7)	3,0 ± 1,4 (2,5 ± 0,9)
	—	1,4 ± 0,7	6,9 ± 1,1	—	—
Chlorpropamid	200	1,2 ± 0,6	6,3 ± 1,2	—	—
	1000	1,5 ± 0,7	7,6 ± 0,9	—	—
	—	1,0 ± 0,1	—	—	—
DBI	20	0,8 ± 0,15	3,5 ± 0,9 (9,5 ± 1,4)	2,5 ± 0,7 (10,7 ± 1,5)	2,4 ± 0,4 (6,5 ± 1,1)
	50	0,7 ± 0,2	2,6 ± 0,8 (9,6 ± 1,7)	1,6 ± 0,4 (10,7 ± 1,4)	1,2 ± 0,4 (6,5 ± 1,4)
	100	0,7 ± 0,2	1,9 ± 0,6 (9,5 ± 1,4)	1,4 ± 0,2 (9,7 ± 1,8)	1,0 ± 0,3 (6,2 ± 1,0)
	—	—	—	—	—

In Klammern: Kontrollen ohne Zusatz des Präparates.

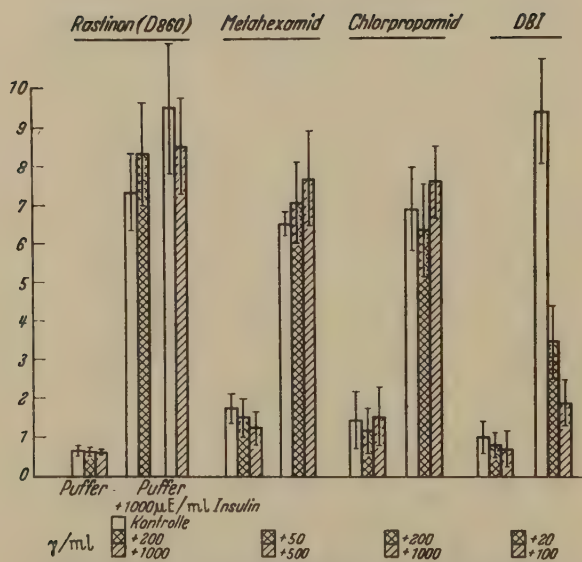


Abb. 1. Einfluß von Sulfonylharnstoffen und Biguanid auf die Glucose-1-C¹⁴-Oxydation zu C¹⁴O₂ (Impulse/min/mg Fett)

Tabelle 2. Glucoseaufnahme durch das Rattenfettgewebe nach Zusatz verschiedener Sulfonylharnstoffe und Biguanid
(mg/100 mg Fett $\times 10^{-2}$)

Präparat		Inkubationsmedium	
		Puffer	Puffer + 1000 μ E/ml Insulin
D 860 (Rastinon)	—	8,1 $\pm$ 2,0	22,2 $\pm$ 5,5
	200	8,1 $\pm$ 3,1	24,6 $\pm$ 6,1
	1000	8,1 $\pm$ 2,5	24,4 $\pm$ 6,9
DBI	—	7,4 $\pm$ 2,0	35,0 $\pm$ 5,1
	20	17,6 $\pm$ 3,9	43,2 $\pm$ 6,9
	100	15,2 $\pm$ 4,0	42,4 $\pm$ 7,0
Metahexamid	—	7,8 $\pm$ 1,9	50,7 $\pm$ 13,0
	50	13,2 $\pm$ 3,2	54,5 $\pm$ 11,0
	500	7,7 $\pm$ 1,7	49,5 $\pm$ 8,0
Chlorpropamid	—	7,8 $\pm$ 1,7	47,8 $\pm$ 7,2
	200	16,5 $\pm$ 3,5	40,5 $\pm$ 9,2
	1000	8,4 $\pm$ 2,1	28,2 $\pm$ 6,4

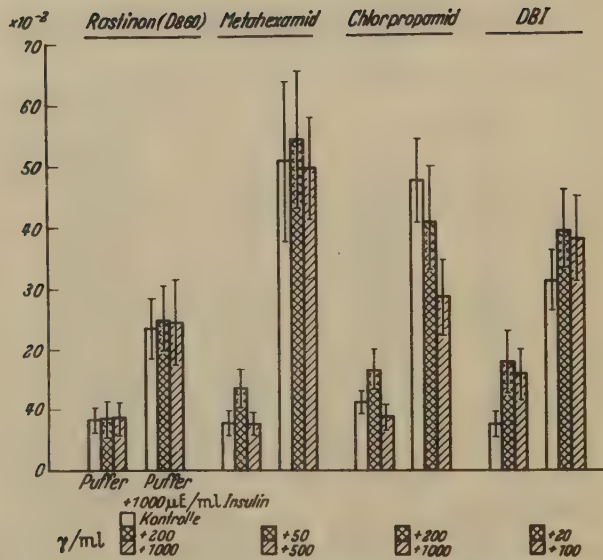


Abb. 2. Einfluß von Sulfonylharnstoffen und Biguanid auf die Glucoseaufnahme durch das Rattenfettgewebe (mg/100 mg Fett)

Tabelle 3. *Glucoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell nach Zusatz von D 860 (Rastinon), DBI, Chlorpropamid und Insulin (mg/100 mg Zwerchfell $\times 10^{-2}$)*

Präparat	Inkubationsmedium		Änderung (Prozent des Ausgangs- wertes)
	Puffer	Puffer + Präparat- zusatz	
D 860 (500 γ /ml). . . .	61,5 $\pm$ 10,5	60,6 $\pm$ 6,9	- 1
DBI (100 γ /ml)	49,8 $\pm$ 9,3	56,4 $\pm$ 6,4	+ 13
Chlorpropamid (250 γ /ml)	51,6 $\pm$ 10,0	58,3 $\pm$ 10,3	+ 13
Insulin (1000 μ E/ml) . .	53,2 $\pm$ 9,9	85,6 $\pm$ 7,9	+ 61

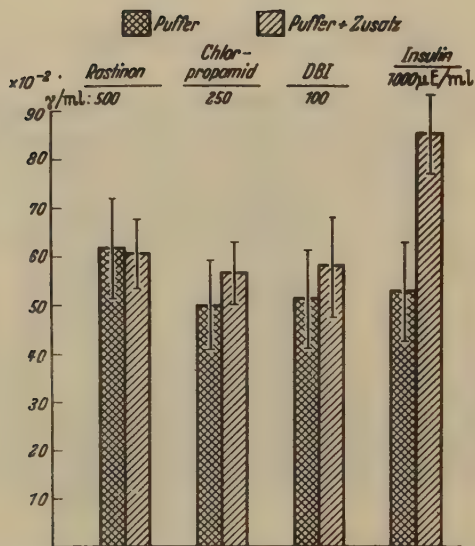


Abb. 3. Einfluß von Rastinon, Chlorpropamid und DBI auf die Glucoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell (mg/100 mg Zwerchfell)

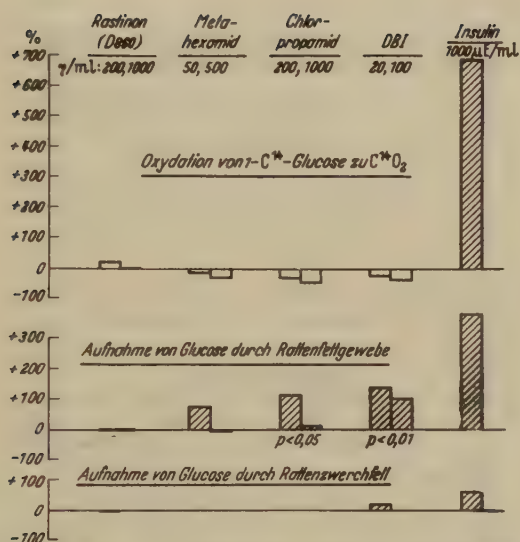


Abb. 4. Wirkung von Sulfonylharnstoffen, Biguanid (DBI) und Insulin auf die Oxydation und Aufnahme von Glucose durch das Rattenfettgewebe und Rattenzwerchfell aus Pufferlösung in Prozent des Ausgangswertes

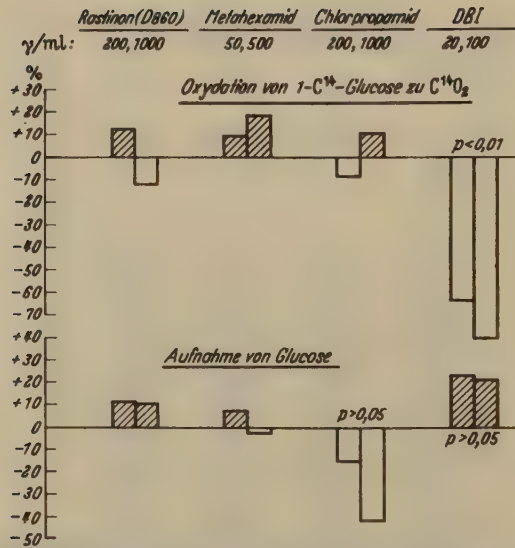


Abb. 5. Änderung der Insulinwirkung (1000 μ E/ml) auf Oxydation und Aufnahme von Glucose durch Rattenfettgewebe in Puffer nach Zusatz von Sulfonylharnstoffen und Biguanid (DBI) in Prozent des Ausgangswertes

E. Zusammenfassung

1. Der in-vitro-Effekt mehrerer hypoglykämisch wirkender Sulfonylharnstoffe (D 860, Metahexamid und Chl α -propamid) und eines Biguanids (DBI) auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Rattenfettgewebes und -zwerchfells wurde in Pufferlösung und im Serum untersucht und mit der Insulinwirkung verglichen.
2. Die Oxydation von 1-C¹⁴-Glukose zu C¹⁴O₂ durch das Rattenfettgewebe wurde nach Zusatz von 1000 microE/ml kristallisierten Insulins um durchschnittlich 600 % gesteigert.
3. Die Glukoseaufnahme durch das Fettgewebe erfuhr durch die gleiche Insulinmenge einen Anstieg um 399 %.
4. Die Glukoseaufnahme durch das Rattenzwerchfell wurde durch Insulin nur um 61 % gesteigert.
5. Die Sulfonylharnstoffe verursachten weder eine signifikante Steigerung der Glukoseoxydation noch der Glukoseaufnahme durch Rattenfettgewebe und -zwerchfell.
6. Eine Änderung der Insulinwirkung konnte nach Zusatz der Sulfonylharnstoffe nicht beobachtet werden.
7. Phenylaethyl-biguanid (DBI) erwies sich bei der Prüfung in Pufferlösung als unwirksam auf die Glukoseoxydation.
8. Die Wirkung von kristallisiertem bzw. endogenem Insulin auf die Glukoseoxydation durch das Rattenfettgewebe erfährt durch DBI bereits in einer Konzentration von 20 gamma/ml eine Hemmung um 64 % bzw. um 77 %. Für 100 gamma/ml betrugen die Werte 80 % bzw. 84 %.
9. Die Glukoseaufnahme des Fettgewebes und des Zwerchfells erfuhr unter DBI-Wirkung eine leichte Steigerung.

Literatur

- (1) Franke, H. und Fuchs, J.: Ein neues antidiabetisches Prinzip. Dtsch. Med. Wschr. 80, 1949-1952 (1955).
- (2) Loubatières, A.: Analyse du mécanisme de l'action hypoglycémiant du p-amino-benzène-sulfamido-isopropylthiodiazol (2254 RP). Compt. rend. Soc. Biol. 138, 766 (1944).
- (3) Bertram, F., Bendfeldt, E. und Otto, H.: Über ein wirksames perorales Antidiabeticum (BZ 55). Dtsch. Med. Wschr. 80, 1455-1456 (1955).
- (4) Pfeiffer, E. F., Steigerwald, H., Sandritter, W., Bänder, H., Meyer, A., Becker, U., und Retiene, K.: Vergleichende Untersuchungen von Morphologie und Hormongehalt des Kälberpankreas nach Sulfonylharnstoffen. Dtsch. Med. Wschr. 82, 1568-1574 (1957).
- (5) Sandritter, W., Becker, U., Müller, D., u. Pfeiffer, E. F.: Histochemische Untersuchungen zur Frage der Funktion der B-Zellen der Langerhansschen Inseln nach Stimulierung mit D 860. Endocrinologie 37, 193-217 (1959).
- (6) Pfeiffer, E. F., Renold, A. E., Martin, D. B., Dagenais, Y. M., Meakin, J. W., Nelson, D. H., Shoemaker, G. und Thorn, G. W.: Untersuchungen über die Rolle des Pankreas im Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe. In: Diabetes mellitus, III. Kongr. Intern. Diabetes Federation 1958, Thieme, Stuttgart, 286 (1959).
- (7) Pfeiffer, E. F., Pfeiffer, M., Ditschuneit, H. und Chang-Su Ahn: Clinical and experimental studies of insulin secretion following tolbutamide and metahexamide administration. Ann. N. Y. Acad. Sci. 82, 479-495 (1959).
- (8) Gemmill, C. L.: Effects of glucose and of insulin on metabolism of isolated diaphragm of rat. Bull. Johns Hopkins Hospital 68, 329-336 (1941).
- (9) Krahle, M. E.: The effect of insulin and pituitary hormones on glucose uptake in muscle. Ann. N. Y. Acad. Sci. 54, 649-670 (1951).
- (10) Tuerkischer, E. and Wertheimer, E.: Glycogen and adipose

- tissue. J.Physiol. (London) 100, 385-409 (1942).
- (11) Fawcett, D.W.: Histological observations on relation of insulin to deposition of glycogen in adipose tissue. Endocrinology 42, 454-467 (1948).
- (12) Rose, G. and Shapiro, B.: Synthesis of fatty acids and glycogen by adipose tissues in vitro. Biochim. et Biophys.Acta 18, 504-510 (1955).
- (13) Shapiro, B. and Wertheimer, E.: Synthesis of fatty acids in adipose tissue in vitro. J.Biol.Chem. 173, 725-728 (1948).
- (14) Feller, D.D.: Metabolism of adipose tissue; incorporation of acetate carbon into lipides by slices of adipose tissue. J.Biol.Chem. 206, 171-180 (1954).
- (15) Hausberger, F.X., Milstein, S.W., and Rutman, R.J.: Influence of insulin on glucose utilization in adipose tissues in vitro. J.Biol.Chem. 208, 431-438 (1954).
- (16) Milstein, S.W.: Oxydation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue. Proc.Soc.Exptl. Mol.Med. 92, 632-635 (1956).
- (17) Jeanrenaud, B. and Renold, A.E.: Studies on rat adipose tissue in vitro. IV. Metabolic patterns produced in rat adipose tissue by varying insulin and glucose concentrations independently from each other. J.Biol.Chem. 234, 3082-3087 (1959).
- (18) Winegrad, A.J. and Renold, A.E.: Effects of insulin on the metabolism of specifically labeled glucose. J.Biol.Chem. 233, 273-276 (1958).
- (19) Cahill jr., G.F., Leboeuf, B., and Renold, A.E: Studies on rat adipose tissue in vitro. III. Synthesis of glycogen and glyceride-glycerol. J.Biol. Chem. 234, 2540-2543 (1959).
- (20) Groen, J., Kamminga, C.E., Willebrands, A.F., and Blickman, J.R.: Evidence for presence of insulin in blood serum. Method for approximate determination of insulin content in blood. J.Clin.Invest. 31, 97-106 (1952).

- (21) Martin, D.B., Renold, A.E., and Dagenais, Y.M.: An assay for insulin-like activity using rat adipose tissue. *Lancet* II/1958, 76-77.
- (22) Milstein, S.W. and Hausberger, F.X.: Lipogenesis and carbohydrate utilization; effects of glucose concentration and insulin in rat adipose tissue. *Diabetes* 5, 89-92 (1956).
- (23) Randle, P.J.: Assay of plasma insulin activity by rat-diaphragm method. *Brit. Med. J.* I, 1237-1240 (1954).
- (24) Vallance-Owen, J. and Hurlock, B.: Estimation of plasma-insulin by the rat diaphragm method. *Lancet* I/1954, 68-70.
- (25) Beigelman, B.M.: Bio-assay for insulin-like activity utilizing glucose uptake by adipose tissue. *Metabolism* 9, 580-586 (1960).
- (26) Dulin, W.E.: persönl. Mitteilung (1961).
- (27) Creutzfeld, W. und Böttcher, K.: die Wirkung des D 860 auf den Alloxandabetes des Kaninchens. *Dtsch. Med. Wschr.* 81, 896-899 (1956).
- (28) Craig, J.W., Molzahn, V.J., Woodward, H., and Miller, M.: Direct effects of tolbutamide and insulin on peripheral glucose uptake; a comparative studie in man. *Diabetes* 7, 267-271 (1958).
- (29) Recant, L. and Fischer, G.L.: Studies on the mechanism of tolbutamide hypoglycemia in animal and human subjects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 62-70 (1957).
- (30) Ashmore, J., Cahill jr., G.F., and Earle, A.S.: Studies on the disposition of isotopic glucose in vivo and in vitro under the influence of sulfonylureas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 131-140 (1957).
- (31) Cahill, G.F., Hastings, A.B., and Ashmore, J.: Effects of substituted sulfonylureas on rat diaphragm and liver tissue. *Diabetes* 6, 26-27 (1957).
- (32) Field, J.B.: Effects of sulfonylureas on rat diaphragm. *Diabetes* 6, 30 (1957).

- (33) v. Holt, C.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungsweise eines antidiabetischen Harnstoffderivates. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 62, 520-523 (1956).
- (34) Rafaelsen, O.J.: Action of oral antidiabetic drugs on carbohydrate metabolism of isolated rat diaphragm. Metabolism 8, 195-204 (1959).
- (35) Rafaelsen, O.J. and Lundbaek, K.: Action of carbutamide on isolated diaphragm of alloxan-diabetic rats. Metabolism 8, 757-761 (1959).
- (36) Renold, A.E., Zahnd, G.R., Jeanrenaud, B., and Boshell, B.: Some effects of tolbutamide and chlorpropamide in vitro. Ann.N.Y.Acad.Sci. 74, 490-498 (1959).
- (37) R-Candela, J.L. and López-Quijada, C.: Influence "in vitro" on the glucose uptake and glycogen synthesis of the epididymal fat by tolbutamide. Med. Exp. 2, 40-41 (1960).
- (38) Ditschuneit, H., Pfeiffer, E.F., Blay, E. und Rossenbeck, H.G.: In-vitro-Effekte von oralen Antidiabetica und Stoffwechselhormonen auf den Verbrauch und die Oxydation von Glukose durch das epididymale Fettgewebe der Ratte, Vergleich mit Insulin. Symp.Dtsch.Ges.Endocrinologie, Homburg a.d.Saar, Springer, 194-198 (1961).
- (39) Ditschuneit, H., Pfeiffer, E.F. und Rossenbeck, H.G.: In-vitro-Effekte von oralen Antidiabetica, menschlichem und tierischem Wachstumshormon und anderen Stoffwechselhormonen auf den Kohlenhydratstoffwechsel von Rattenfettgewebe und Rattenzwerchfell, Vergleich mit Insulin. I.Intern.Congr.Endocrinol.Kopenhagen 1960, Abstr. 656 (1960).
- (40) Ungar, G., Freedman, L., and Shapiro, S.L.: Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 95, 190-192 (1957).
- (41) Watanabe, C.K.: Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases; in-

- fluence of injected guanidine hydrochloride upon blood sugar content. *J.Biol.Chem.* 33, 253-265(1918).
- (42) Frank,E., Nothmann,M. und Wagner,A.: Über synthetisch dargestellte Körper mit insulinartiger Wirkung auf den normalen und diabetischen Organismus. *Klin.Wschr.* 5, 2100 (1926).
- (43) Nielsen,R.L., Swanson,H.E., Tanner,D.C., Williams,R.H., and O'Connel,M.: Effects on blood sugar of a new potent hypoglycemic compound. *A.M.A.Arch. Int.Med.* 101, 211-215 (1958).
- (44) Pomeranze,J., Fujiy,H., and Mouratoff,G.T.: Clinic report of a new hypoglycemic agent. *Proc.Soc.Exptl. Biol.Med.* 95, 193-194 (1957).
- (45) Krall,L.P. and Camerine-Davalos,R.: Clinical trials with DBI, a new non-sulfonylurea oral hypoglycemic agent. *A.M.A.Arch.Int.Med.* 102, 25 (1958).
- (46) Williams, R.H., Tyberghein,J.M., Hyde,P.M., and Nielsen,R.L.: Studies related to the hypoglycemic action of phenylethyl-biguanide. *Metabolism* 6, 311 (1957).
- (47) Steiner,D.F., and Williams,R.H.: Respiratory inhibition and hypoglycemia by biguanides and decamethylendiguanide. *Biochim.et Biophys.Acta* 30, 329(1958).
- (48) Wick,A.N., Larson,E.R., and Serif,G.S.: A site of action of phenylethylbiguanide, a hypoglycemic compound. *J.Biol.Chem.* 233, 296 (1958).
- (49) Ungar,G., Psychoyos,S., and Hall,H.A.: Action of phenylethylbiguanide, a hypoglycemic agent, on tricarboxylic acid cycle. *Metabolism* 9, 36-51(1960).
- (50) Baumgärtel,T.: Zur Kenntnis der Vitamin H-Wirkung. *Dtsch.Med.Wschr.* 69, 748-749 (1943).
- (51) McShan,W.H., Meyer,R.K., and Erway,W.F.: Effects of estrogens and androgens on succinase system of rat tissues. *Arch.Biochem.Biophysics* 15, 99-110 (1947).
- (52) Altman,K.I.: Effects of sulfonamides on respiratory enzymes. *J.Biol.Chem.* 166, 149-160 (1946).

- (53) Fajans, S.S., Moorhouse, J.A., Doorenbos, H., Louis, L.H., and Conn, J.W.: DBI-Symposion Houston (Texas) (1959).
- (54) Forbath, N. and Clarke, D.W.: The effect of phenylethylbiguanide upon the metabolism of the isolated rat diaphragm. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37, 881-886 (1959).
- (55) Odell, W.D., Tanner, D.C., Steiner, D.F., and Williams, R.H.: Phenylethyl-, amyl-, and isoamylbiguanide in the treatment of diabetes mellitus. *A.M.A.Arch. Int.Med.* 102, 520-526 (1958).
- (56) McKendry, J.B., Kuwayti, K., and Rado, P.P.: Clinical experience with DBI (phenformin) in the management of diabetes. *Canad.Med.Ass.J.* 80, 773-778 (1959).
- (57) Skillman, Th.G., Kruger, F.A., and Hamwi, G.J.: Metabolic and endocrine studies with phenylethyldiguanide (DBI). *Diabetes* 8, 274-278 (1959).
- (58) Hall, G.H., Crowley, M.F., and Bloom, A.: Oral treatment of diabetes; trial of phenylethylbiguanide (DBI). *Brit.Med.J.* 1958/II, 71-74.
- (59) Walker, R.S. and Linton, A.L.: Phenylethyldiguanide: a dangerous side-effect. *Brit.Med.J.* 5158, 1005-1006 (1959).

Lebenslauf

Am 10. März 1937 wurde ich als Sohn des a.pl.Professors Dr.med. Heinrich Rossenbeck in Gießen/L. geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Brünn (CSR), Altmünster (Oberösterreich) und Ellwangen/Jagst (Württemberg) trat ich im Herbst 1947 in das Ellwanger Gymnasium für Jungen ein. Nach der Übersiedelung nach Frankfurt/M. im Jahre 1954 legte ich im März 1956 an der hiesigen Carl Schurz-Schule das Abitur ab und begann im Sommersemester 1956 mit dem Medizinstudium an der Frankfurter Universität, wo ich 1958 das Physikum bestand. Im Sommersemester 1959 studierte ich an der Universität in Freiburg i.Br. Die ärztliche Prüfung legte ich 1962 in Frankfurt/M. ab.

